

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION



### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 AVR. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Martine PLANCHE", is placed over the typed name.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUETE**
**EN DÉLIVRANCE D'UN  
TITRE DE PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE \***

<input checked="" type="checkbox"/>	BREVET D'INVENTION
<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'UTILITÉ
<input type="checkbox"/>	DEMANDE DIVISIONNAIRE
<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la demande initiale

**2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)**

 LE DEMANDEUR REQUIERT  
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRÉ  
DU RAPPORT DE RECHERCHE

 OUI

 NON

 SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET  
SI LE DEMANDEUR EST UNE  
PERSONNE PHYSIQUE, IL  
REQUIERT LE PAIEMENT  
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE  
DU RAPPORT DE RECHERCHE

 OUI

 NON

DATE DE REMISE DES PIÈCES

06 DEC 1995

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

95 14424 -

DATE DE DÉPÔT

06 DEC. 1995

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

4 NUMERO DU POUVOIR PERMANENT

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET LAVOIX**  
 2 Place d'Estienne d'Orves

75441 PARIS CEDEX 09

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

BFF 95/421

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

48 74 92 22

**7 TITRE DE L'INVENTION**

Polypeptide récepteur de l'IL-13.

**8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique**

N° SIREN

Société dite : SANOFI

**9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)**

PAYS

32-34, rue Marbeuf 75008 PARIS

FR

**10 NATIONALITÉ(S)**  
 Française

**REDEVANCES VERSÉES**
**11 INVENTEUR(S)**

 LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE  
INVENTEUR

12

 SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE  
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL  
REQUIERT OU A REQUIS LA REDUCTION  
DES REDEVANCES\*

 OUI

 NON

 DE DÉPÔT

DE

 DE RAPPORT DE RECHERCHE

 DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

 DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

**13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ  
OU REQUETE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTERIEURE**

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

**14**
 DIVISIONS

 ANTIÉRIEURES A LA  
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

**15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**  
 CABINET LAVOIX  
 C. POLUS N° 95.1200

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RÉCEPTION

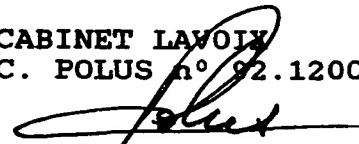
SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

**Division Administrative des Brevets****DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR**

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9514424

**Titre de l'invention : Polypeptide récepteur de l'IL-13.****Le (s) soussigné (s)****Société dite : SANOFI  
32-34, rue Marbeuf 75008 PARIS FRANCE****désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :****Daniel CAPUT  
La Bousqui  re  
31290 AVIGNONET LAURAGAIS FRANCE****Pascual FERRARA  
Libouilie Saint-Assiscle  
31290 AVIGNONET LAURAGAIS FRANCE****Patrick LAURENT  
Chemin Calmontais  
"Clochettes"  
31190 AUTERIVE FRANCE****Natalio VITA  
45bis, Chemin Al Cers  
31450 MONTGiscard FRANCE****NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société d閏posante ou titulaire.****Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire****Paris, le 6 décembre 1995****CABINET LAVOIX  
C. POLUS n   92.1200**

La présente invention concerne un polypeptide purifié ayant une activité de récepteur spécifique de l'interleukine 13 (IL-13), ses fragments biologiquement actifs et les séquences d'acides nucléiques correspondantes, et ses applications.

L'IL-13 est une cytokine de 112 acides aminés récemment identifiée (1,2), secrétée par des lymphocytes T activés, les lymphocytes B et les mastocytes après activation.

De par ses nombreuses propriétés biologiques communes avec l'IL-4, l'IL-13 a été décrite comme étant une cytokine "IL-4-like". Ses activités sont en effet similaires à celles de l'IL-4 sur les cellules B (3-5), les monocytes (6-10) et autres cellules non hématopoïétiques (11-12). En revanche, contrairement à l'IL-4, elle n'exerce pas d'effet particulier sur des cellules T au repos ou activées (13).

Les différentes activités biologiques de l'IL-13 sur les monocytes/macrophages, les lymphocytes B et certains précurseurs hématopoïétiques ont été décrites en détail par A.J. Minty, ainsi que dans des articles de revues sur l'IL-13 (voir par ex. 14). Plusieurs données indiquent en outre que cette cytokine a un effet pleiotrope sur d'autres types cellulaires. Ces cellules non-hématopoïétiques affectées directement par l'IL-13 sont des cellules endothéliales et microgliales, des kératinocytes, et des carcinomes de rein et de colon.

Les activités anti-inflammatoires et immuno-régulatrices de l'IL-13 peuvent être utiles par exemple dans le traitement des pathologies auto-immunes, tumorales et virales.

Une mise à profit de ces propriétés biologiques au plan clinique nécessite toutefois une parfaite

connaissance des signaux et mécanismes par lesquels ces effets sont exercés, de façon à pouvoir les contrôler et les moduler dans les pathologies concernées.

5 L'une des étapes dans l'analyse du signal transmis par une molécule biologique au sein d'une cellule, consiste à identifier son récepteur membranaire. Les travaux réalisés à cet effet sur le récepteur de l'IL-13 ont montré que l'IL-13 et l'IL-4 avaient en commun un récepteur, ou tout au moins certains des 10 composants d'un complexe récepteur, ainsi que des éléments de transduction de signaux (15-18). Ce récepteur est présent à la surface de différents types cellulaires, en nombre variable selon le type cellulaire considéré. La distribution comparative des récepteurs de l'IL-13 et 15 de l'IL-4 a été indiquée par A.J. Minty (14).

20 Kondo et al. (19) ont décrit la structure d'un récepteur de haute affinité pour l'IL-4. Celui-ci est un dimère, formé par l'association d'une glycoprotéine de 140 kDa (IL-4R) et de la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2 ( $\gamma$ C). L'IL-4 peut se lier à la sous-unité glycoprotéique de 140 kDa (IL-4R ou gp 140) avec une bonne affinité (Kd comprise entre 50 et 100 pM) (15). Cependant, cette affinité est augmentée d'un facteur 2 25 à 3, lorsque la chaîne  $\gamma$ C est associée à la gp 140. Cette association est en outre nécessaire à la transmission de certains signaux médiés par l'IL-4 (19,20).

30 Des expériences de compétition croisée pour la liaison, soit de l'IL-13, soit de l'IL-4, ont démontré que l'IL-4 peut normalement empêcher la liaison de l'IL-13, alors que l'IL-13 ne peut généralement empêcher que partiellement la liaison de l'IL-4 à son récepteur (17,21), et ne se fixe sur aucune des deux sous-unités du récepteur de l'IL-4, ni sur le complexe formé par leur association. Sur la base de ces observations, les auteurs 35 de la présente invention ont supposé que le récepteur

spécifique de l'IL-13 était constitué du complexe récepteur IL-4 associé avec un autre composant liant l'IL-13.

Des travaux réalisés sur une lignée cellulaire érythroleucémique capable de proliférer en réponse à l'IL-13 et à l'IL-4 (lignée TF-1), leur ont permis de montrer que ces deux cytokines produisaient des événements intracellulaires similaires après fixation sur leur récepteur (18). En parallèle, des expériences de pontage ("cross-link") leur ont permis de montrer que la gp 140 pouvait former des hétérodimères soit avec la chaîne  $\gamma$ , soit avec une nouvelle sous-unité, d'un poids moléculaire de 55 à 70 kDa (17, 21).

Compte tenu de l'importance au plan médical de la compréhension fine des phénomènes de régulation de l'IL-4 et de l'IL-13, et en particulier de la possibilité de pouvoir séparer et contrôler isolément les effets produits par l'une ou l'autre de ces deux cytokines, les auteurs de la présente invention se sont intéressés à la caractérisation de la sous-unité liant spécifiquement l'IL-13 au sein du complexe récepteur commun à l'IL-4 et l'IL-13.

Ceux-ci ont à présent identifié une lignée cellulaire de carcinome humain exprimant le récepteur spécifique de l'IL-13 en quantité plus importante que d'autres lignées de carcinome rénal humaines connues (21), et ont réalisé le clonage de la sous-unité responsable de la fixation de l'IL-13 sur le complexe récepteur de l'IL-4/IL-13.

La présente invention concerne donc des polypeptides purifiés liant spécifiquement l'IL-13.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet un polypeptide purifié dont la séquence d'acides aminés correspond à celle d'un récepteur spécifique de l'IL-13, ou des fragments biologiquement actifs de celui-

ci.

L'invention a également pour objet des séquences d'ADN isolées codant pour ledit polypeptide ou ses fragments biologiquement actifs.

5 Elle vise en outre les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, et les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs d'expression dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de l'une 10 desdites séquences nucléotidiques.

Les méthodes de production du récepteur de l'IL-13 recombinant ou de ses fragments biologiquement actifs par les cellules hôtes transfectées font également partie de l'invention.

15 L'invention comprend également des compositions pharmaceutiques comprenant le récepteur spécifique de l'IL-13 ou des fragments biologiquement actifs de celui-ci pour la régulation des mécanismes immunologiques et inflammatoires produits par l'IL-13. Elle vise en 20 outre une méthode pour l'identification d'agents capables de moduler l'activité du récepteur spécifique de l'IL-13, et l'utilisation du récepteur de l'IL-13 ou de fragments de celui-ci pour le criblage de ces agents ainsi que pour 25 la fabrication de nouveaux produits capables de moduler l'activité du récepteur de l'IL-13.

L'invention comprend également des anticorps ou des dérivés d'anticorps spécifiques du récepteur de l'IL-13.

30 Elle vise enfin une méthode de traitement thérapeutique pour moduler les réactions immunologiques médiées par l'IL-13, comprenant l'administration à un patient du récepteur spécifique de l'IL-13 ou d'un de ses fragments biologiquement actif ou d'un composé capable 35 de moduler spécifiquement l'activité de ce récepteur, en association avec un véhicule pharmaceutiquement accepta-

ble.

Dans la description de l'invention ci-après, on utilise les définitions suivantes :

5 - récepteur de l'IL-13 (IL-13R) : un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés n° 2 ou tout fragment ou dérivé de celui-ci biologiquement actif ;

10 - biologiquement actif : capable de se lier spécifiquement à l'IL-13 et/ou de participer à la transduction du signal spécifiquement produit par l'IL-13 au niveau de la membrane cellulaire, et/ou capable d'interagir avec le récepteur spécifique de l'IL-4 (IL-4R/gp 140) pour former un complexe capable de lier l'IL-4 et l'IL-13, et/ou qui est reconnu par des anticorps spécifiques du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2, et/ou capable 15 d'induire des anticorps qui reconnaissent le polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ;

20 - dérivé : tout polypeptide variant du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou toute molécule résultant d'une modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence SEQ ID n° 2, c'est-à-dire obtenue par mutation, délétion, addition, substitution et/ou modification chimique d'un seul ou d'un nombre limité d'acides aminés, ainsi que toute séquence isoforme, c'est-à-dire une séquence identique à la séquence SEQ ID n° 2, à l'un de ses fragments ou séquences modifiées, contenant un ou plusieurs acides aminés sous la forme d'énanthiomère D, lesdites séquences variées, modifiées ou isoformes ayant conservé au moins l'une des propriétés les rendant biologiquement actives.

25 30 La présente invention a pour objet un polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :

a) la séquence SEQ ID n° 2,

35 b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 2, selon la définition donnée

précédemment.

La fabrication de dérivés peut avoir différents objectifs, dont en particulier celui d'augmenter l'affinité du récepteur pour l'IL-13, celui d'améliorer ses taux de production, d'augmenter sa résistance à des protéases, de modifier son activité biologique ou de lui conférer de nouvelles propriétés pharmaceutiques et/ou biologiques.

Parmi des variants biologiquement actifs des polypeptides tels que définis précédemment, on préfère les fragments produits par épissage alternatif des transcrits (ARN messagers) du gène codant pour l'une des séquences d'acides aminés décrites ci-dessus.

Dans une variante avantageuse, les 8 acides aminés C-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 sont substitués par les 6 acides aminés suivants : NH<sub>2</sub>-VRCVTL-COOH.

Selon un autre aspect avantageux, l'invention vise une forme soluble de l'IL-13R comprenant notamment le domaine extra-cellulaire du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'au résidu 337.

Le polypeptide qui comprend la séquence SEQ ID n° 2 représente un mode de réalisation particulier de l'invention. Comme cela apparaîtra dans les exemples, ce polypeptide peut être exprimé à la surface de cellules humaines pour former un récepteur de l'IL-13 fonctionnel et s'associer avec le récepteur de l'IL-4 pour former, avec la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2 le complexe récepteur commun à l'IL-4 et l'IL-13.

La présente invention a également pour objet une séquence d'acides nucléiques isolée, choisie parmi:

- a) la séquence SEQ ID n° 1,
- b) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 1 et codant pour un

polypeptide ayant une activité de récepteur de l'IL-13, c) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) du fait de la dégénérescence du code génétique.

5 Plus particulièrement, l'invention a pour objet une séquence codant pour la partie soluble de l'IL-13R et tout variant produit par épissage alternatif des transcripts de l'IL-13R, conservant au moins une des propriétés biologiques décrites.

10 Un mode de réalisation préféré est représenté par une séquence d'acides nucléiques comprenant ou constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1081, et préférentiellement jusqu'au nucléotide 1063 sur la séquence SEQ 15 ID n° 1.

20 Avantageusement, la séquence d'acides nucléiques selon l'invention est une séquence codant pour une protéine correspondant à la forme mature du récepteur de l'IL-13, cette protéine mature étant le résultat de la libération du peptide signal.

25 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

30 Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

35 Ces séquences nucléotidiques permettent la réalisation de sondes nucléotidiques, capables de

s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'acides nucléiques , y compris un ARN messager, codant pour un polypeptide selon l'invention ou un fragment biologiquement actif de celui-ci. De telles sondes font également partie de l'invention. Elles peuvent être utilisées comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par des expériences d'hybridation, de transcripts spécifiques des polypeptides de l'invention dans des échantillons biologiques ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques résultant d'un polymorphisme, de mutations ou d'un mauvais épissage.

Les sondes de l'invention comportent au minimum 10 nucléotides, et au maximum comportent la totalité de la séquence nucléotidique SEQ ID n°<1. ou de son brin complémentaire.

Parmi les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à 15 nucléotides, les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier.

Préférentiellement, les sondes de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier (marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent, enzymatique, etc).

Les méthodes de diagnostic *IN VITRO* dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en oeuvre pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques, telles que la perte d'hétérozygotie et le réarrangement génétique, au niveau des séquences nucléiques codant pour un polypeptide récepteur de l'IL-13 ou un fragment biologiquement actif, sont incluses dans la présente invention. Un tel type de méthode comprend :

35 - la mise en contact d'une sonde nucléotidique de l'invention avec un échantillon biologique dans

des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;

5 - la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;

- éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.

10 Les sondes d'ADNC de l'invention sont en outre avantageusement utilisables pour la détection d'anomalies chromosomiques.

15 Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont par ailleurs des utilisations dans le domaine thérapeutique, pour la réalisation de séquences antisens, utilisables en thérapie génique. L'invention a ainsi pour objet des séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, la production de polypeptides récepteurs de l'IL-13, tels que définis précédemment. De telles 20 séquences sont avantageusement constituées par celles qui constituent le cadre de lecture codant pour l'IL-13R au niveau du transcript.

25 Elles sont plus particulièrement utilisables dans le traitement des allergies et de l'inflammation.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent par ailleurs être utilisées pour la production de polypeptides recombinants ayant une activité de récepteur de l'IL-13, tels que précédemment définis.

30 Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence nucléotidique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. L'hôte cellulaire utilisé peut être 35

choisi parmi des systèmes procaryotes, comme les bactéries, ou eucaryotes, comme par exemple les levures, cellules d'insectes, CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ou tout autre système avantageusement disponible dans le commerce. Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des polypeptides de l'invention est constitué par la lignée fibroblastique COS-7.

Les signaux contrôlant l'expression des polypeptides (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réPLICATION autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation.

Les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus font également partie de la présente invention.

Dans le cas des cellules COS-7 la transfection peut être réalisée à partir du vecteur pSE-1, comme décrit dans (17).

L'invention vise en outre les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réPLICATION et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Ces cellules sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide recombinant de

5 séquence SEQ ID n° 2 ou dérivée, méthode elle-même comprise dans la présente invention, et caractérisée en ce que l'on cultive les cellules transfectées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou dérivée, et que 10 l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

10 Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono ou polyclonaux spécifiques, etc.

15 20 Les anticorps mono ou polyclonaux capables de reconnaître spécifiquement le récepteur de l'IL-13 selon la définition donnée précédemment font également partie de l'invention. Des anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre le récepteur de l'IL-13 selon les modes opératoires usuels.

25 Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybrides décrite par Köhler et Milstein (Nature (1975) p. 195).

30 Des anticorps avantageux sont des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur de l'IL-13.

35 Les anticorps selon l'invention sont par exemple des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F (ab')2. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués. Par exemple, ils peuvent être associés à une toxine, telle la toxine diphtérique ou à un produit radioactif. Ces immunotoxines peuvent dans ce cas constituer des agents thérapeutiques utilisables pour le

traitement de certaines pathologies impliquant une surexpression du récepteur de l'IL-13.

5 Les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux peuvent également être utilisés pour l'analyse par immunocytochimie des récepteurs de l'IL-13 sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immunoperoxidase...

10 Ils peuvent ainsi être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression du récepteur de l'IL-13 doit être observée (surexpression anormale, suivie de la régulation de l'expression membranaire, etc.).

15 L'invention concerne donc également un procédé de diagnostic *IN VITRO* de pathologies corrélées à une expression anormale du récepteur de l'IL-13, à partir de prélèvements biologiques susceptibles de contenir le récepteur de l'IL-13 exprimé à un taux anormal, caractérisé en ce que l'on met en contact au 20 moins un anticorps de l'invention avec ledit prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et le ou lesdits anticorps et en ce que l'on détecte les complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

25 L'invention concerne également un kit pour le diagnostic *IN VITRO* d'une expression anormale du récepteur de l'IL-13 dans un prélèvement biologique et/ou pour la mesure du taux d'expression du récepteur de l'IL-13 dans ledit prélèvement comprenant :

30 - au moins un anticorps spécifique du récepteur de l'IL-13, éventuellement fixé sur un support,  
35 - des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et ledit anticorps et/ou des moyens de

quantification de ces complexes.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode pour l'identification et/ou l'isolement de ligands spécifiques du récepteur de l'IL-13 ou d'agents capables de moduler son activité, caractérisée en ce que l'on met en contact un composé ou un mélange contenant différents composés, éventuellement non-identifiés, avec des cellules exprimant à leur surface le récepteur de l'IL-13, dans des conditions permettant l'interaction entre le récepteur de l'IL-13 et ledit composé, dans le cas où celui-ci possèderait une affinité pour le récepteur, et en ce que l'on détecte et/ou isole les composés liés au récepteur de l'IL-13 ou ceux capables d'en moduler l'activité biologique.

Dans un mode particulier, cette méthode de l'invention est adaptée à l'identification et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'IL-13 pour son récepteur.

L'invention comprend également des compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif un polypeptide répondant aux définitions précédentes, préférentiellement sous forme soluble, associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Un tel polypeptide peut en effet agir en compétition avec l'IL-13R exprimé à la surface cellulaire, et constituer de ce fait un antagoniste spécifique de la liaison de l'IL-13 à son récepteur, qui peut avantageusement être mis en oeuvre pour la synthèse d'un médicament destiné à moduler les réactions médiées par l'IL-13 dans des situations pathologiques.

L'invention comprend enfin une méthode de traitement thérapeutique d'affections liées à des réactions immunologiques médiées par l'IL-13, comprenant l'administration à un patient du récepteur spécifique de l'IL-13 (ou d'un de ses fragments biologiquement actif),

ou d'un composé capable d'en moduler spécifiquement l'activité biologique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5                   D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

10                   LEGENDE DES FIGURES

- Figure 1 : caractérisation du récepteur IL-13R présent dans les cellules Caki-1.

15                   a) analyse de Scatchard (cadre inséré) de la courbe de saturation de l'IL-13 marquée à l' $[^{125}\text{I}]$  ;

                     b) liaison de  $[^{125}\text{I}][\text{Phe43}]\text{-IL-13-GlyTyrGlyTyr}$  en présence de concentration croissante d'IL-13 non marquée (•) et d'IL-4 (○) ;

20                   c) expériences de pontage ("cross-link") en utilisant de l'IL-13 radioactive en l'absence (coulée a) et en présence d'un excédent de 100 fois d'IL-13 non marquée (coulée b) ou d'IL-4 (coulée c) ;

25                   d) inhibition de la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-13 et l'IL-4 en présence d'un anticorps monoclonal spécifique de la chaîne IL-4R et de l'antagoniste de IL-4, Y124DIL-4.

- Figure 2 : Séquence nucléotidique de l'ADNC de l'IL-13R, et comparaison des séquences protéiques de l'IL-5R et de l'IL-13R.

30                   a) séquence nucléotidique de l'ADNC de l'IL-13R. Les acides aminés correspondant au peptide signal déduit de la séquence nucléique sont indiqués en italiques et ceux correspondant au domaine transmembranaire sont indiqués en caractères gras. Les sites de N-glyco-

sylation potentiels (Asn-X-Ser/Thr) sont soulignés ;

5 b) alignement des acides aminés des séquences de l'IL-13R et de l'IL-5R. Les séquences protéiques de l'IL-13R et IL-5R humains sont alignées comme décrit précédemment (22). Les résidus cystéine et le motif WSXWS caractéristiques de cette famille de récepteurs sont encadrés.

10 - Figure 3 : Profils d'expression de l'ARNm de l'IL-13R.

L'ARN a été préparé à partir des cellules suivantes : Caki-1 (coulée a), A431 (coulée b), TF-1 (coulée c), U937 (coulée d), Jurkat (coulée e) et IM9 (coulée f).

15 - Figure 4 : Caractérisation du récepteur recombinant de l'IL-13.

Les cellules COS-7 sont transfectées avec l'ADNC de l'IL-13R et utilisées pour :

20 a) des études de liaison de l'IL-13 radiomarquée (cadre inséré), par analyse de Scatchard de la courbe de saturation;

25 b) des expériences de pontage en utilisant de l'IL-13 radiomarquée en absence (coulée a) et en présence d'un excès de 100 fois d'IL-13 non marquée (coulée b) ;

c-d) des expériences de cotransfection en utilisant l'IL-13R cloné, l'IL-4R (gp140) et la chaîne  $\gamma$  suivies par la liaison de l'IL-13 radiomarquée (c) ou de l'IL-4 (d). Les colonnes noires et blanches représentent respectivement la liaison spécifique de l'IL-13 et de l'IL-4.

30 - Figure 5 : Inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R par la forme soluble du récepteur (IL-13Rs) en expression transitoire.

5 L'expression d'IL-13Rs dans le surnageant des cellules transfectées par 2034 est testée par inhibition de la liaison de l'IL-13 sur les cellules transfectées par l'IL-13R. Les surnageants sont testés bruts en les diluant de moitié dans le ligand iodé.

BT : liaison totale

NSB : liaison non spécifique en présence d'un excès d'IL-13 non marquée

10 2036 BT : liaison totale sur cellules transfectées avec le 2036

2036 + sgt 2034 : liaison sur cellules transfectées avec le 2036 en présence de surnageant de cellules transfectées avec le 2034.

15 - Figure 6 : Inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R par la forme soluble du récepteur (IL-13Rs) sur des lignées stables.

T2036-22 : liaison totale sur le clone IL-13R (2036-22)

20 2034-4

2034-6

2034-19

}

4 clones IL-13Rs

2034-21

25 1274-20 : cellules CHO n'exprimant pas l'IL-13Rs.

## 30 MATERIELS ET METHODES

### Expériences de liaison et de pontage :

35 Les expériences de liaison et de pontage sont réalisées comme décrit pour [<sup>125</sup>I][Phe43]-IL-13-GlyTyrGly-Tyr (17).

**Induction de la sécrétion d'IL-6 :**

5 Les cellules Caki-1 (ATCC HTB46) sont mises dans des plaques de 24 trous à une densité de  $5.10^4$  cellules/trou et après 3 jours de culture des monocouches confluantes sont lavées trois fois avec du milieu 10 DMEM sans sérum de veau foetal. La stimulation des cellules Caki-1 est réalisée avec 30 ng/ml d'IL-4 ou d'IL-13 en absence ou en présence de Y124DIL-4 ou d'un 15 anticorps monoclonal anti-gp140. La quantité d'IL-6 libérée dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation est mesurée par une technique ELISA (Innol-test, France).

**Isolement et analyse de l'ADNC de l'IL-13R :**

15 L'ARN total a été extrait des cellules Caki-1 comme décrit précédemment (23). L'ARN poly(A) est isolé des ARN totaux avec des billes magnétiques recouvertes d'oligo(dT)<sub>25</sub> (Dynal). Une banque d'ADNC contenant  $2.10^5$  clones a été construite en utilisant la procédure d'amorces adaptateurs (24) et le vecteur pSE1 (25). La stratégie de clonage pour l'expression qui a été utilisée a été décrite précédemment (17).

**Obtention de l'ADNC de l'IL-13R :**

25 Les échantillons d'ARN sont copiés avec la reverse transcriptase et soumis à une PCR en utilisant une amorce sens correspondant à la séquence + 52 à + 71 et une amorce antisens correspondant à + 489 à + 470 (la numération est faite sur la base de la séquence de l'ADNC montrée sur la figure 2). Les produits amplifiés par PCR 30 sont hybridés avec une sonde complémentaire des séquences + 445 à + 461 de l'ADNC. Les marqueurs de taille sont indiqués à la gauche de la figure.

**Caractérisation des propriétés de l'IL-13R :**

Les cellules COS-7 sont transfectées dans des boîtes de Pétri comme décrit précédemment (17) et 24 heures plus tard les cellules sont trypsinisées et mises en culture dans des plaques de 24 puits à une densité de  $8.10^4$  cellules/puits. Après une culture de 48 heures à 37°C, les cellules sont utilisées soit pour des expériences de liaison (des essais réalisés en triplicata montrent une variation de moins de 10 %) soit pour des expériences de pontage avec de l'IL-13 iodée comme décrit. Pour la transfection, les cellules COS-7 ont été transfectées dans des plaques de 25 cm<sup>2</sup> en utilisant 0,6 µg de différents plasmides. Après 24 heures, les monocouches cellulaires sont trypsinisées et mises en culture dans des plaques à 12 puits à raison de  $8.10^4$  cellules/-puits. Trois jours plus tard, les expériences de liaison sont réalisées avec de l'IL-13 marquée ou de l'IL-4. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences réalisées indépendamment.

20

**EXEMPLES****EXEMPLE 1 :**

25 **Analyse de l'expression de l'IL-13R à la surface des cellules Caki-1**

Il a récemment été découvert que des cellules de carcinome rénal humain exprimaient en plus des récepteurs communs à l'IL-4 et à l'IL-13, un large excès de récepteurs spécifiques de l'IL-13 (21). Sur la base de ces résultats, un échantillon de lignées cellulaires de carcinome humain a été étudié pour la fixation de l'IL-13 comme décrit précédemment (17). Une lignée particulière, 30 Caki-1 (ATCC HTB46), qui exprime un nombre particulière-  
35

ment important de sites de liaisons pour l'IL-13, a été analysée plus en détail. Les courbes de Scatchard obtenues à partir d'expériences de saturation montrent la présence de sites de liaison avec une  $K_d$  de  $446 \pm 50$  pM 5 et une capacité de  $7,2 \cdot 10^4$  récepteurs/cellule (figure 1a). Dans des expériences de compétition, l'IL-13 non marquée déplace totalement l'IL-13 marquée d'une façon dose dépendante, alors que l'IL-4 déplace avec une haute 10 affinité environ 10 % de l'IL-13 marquée. Des concentrations plus importantes d'IL-4 (supérieures à 100 nM) ne déplacent pas les 90 % restants d'IL-13 liée (figure 1b).

15 Ces résultats sont en concordance avec l'existence de deux sites, l'un partagé par les deux cytokines, l'autre spécifique de l'IL-13. Les expériences de pontage par affinité de l'IL-13 montrent un complexe d'environ 70 kDa, qui coïncide avec le complexe observé dans des expériences de pontage similaire avec l'IL-13 dans différents types cellulaires (17,21). L'IL-13 20 marquée est complètement déplacée du complexe par l'IL-13 mais pas par l'IL-4, ce qui est accord avec les expériences de compétition (figure 1c).

25

**EXAMPLE 2 :**

Analyse de la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-4 ou l'IL-13.

30

Les auteurs de l'invention ont analysé la sécrétion induite par l'IL-4 ou l'IL-13 sur des cellules Caki-1. Les deux cytokines induisent la sécrétion de niveaux similaires d'IL-6, et la sécrétion est inhibée par des anticorps spécifiques de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-4R et par l'antagoniste Y124DIL-4 (figure 1d). Ceci suggère que les récepteurs partagés par les deux cytokines dans 35 les cellules Caki-1 sont responsables de l'induction de

la sécrétion d'IL-6. Des résultats similaires sont observés quand la phosphorylation du complexe protéique IRS1/4PS (18) induite par l'IL-4 et l'IL-13 est analysée en présence ou en absence d'anticorps anti-IL-4R et 5 d'antagoniste de l'IL-4.

10 Ces résultats pris dans leur ensemble suggèrent que le complexe récepteur IL-4/IL-13 exprimé dans les cellules Caki est identique à ce qui avait été précédemment décrit et que la protéine liant l'IL-13 (IL-13R) qui est surexprimée, est un composant du récepteur responsable de la reconnaissance de l'IL-13 dans un complexe fonctionnel qui inclut IL-4R.

15 Ces cellules ont donc été utilisées comme source d'ARN messager pour le clonage de cette entité liant l'IL-13.

**EXEMPLE 3 :**

**Clonage du récepteur de l'IL-13**

20 La stratégie de clonage et d'expression qui a été utilisée a été précédemment décrite (17). Une banque d'ADNc contenant  $2.10^5$  clones recombinants a été construite (24) à partir des cellules Caki-1. La banque a été divisée en lots de 1000 ADNc, dont l'ADN de chaque 25 lot sous forme de plasmide a été introduit dans des cellules COS-7 (26). La liaison d'IL-13 marquée aux cellules COS-7 transfectées permet d'identifier les lots de clones codant un récepteur de l'IL-13. Les lots positifs ont été répartis et recrifiables jusqu'à l'identification d'un clone unique capable de réaliser la 30 synthèse d'une protéine de surface cellulaire apte à lier l'IL-13. Deux ADNc de l'IL-13R indépendants ont été finalement isolés. La séquence nucléotidique complète de l'ADNc de l'IL-13R et la séquence d'acides aminés qui en 35 est déduite sont montrées sur la figure 2a. L'ADNc a une

longueur de 1 298 bases en excluant la queue poly-A et a une courte région non traduite en 3' de 106 bases. Un signal canonique de polyadenylation AATAAA se trouve à la place prévue. Le cadre de lecture ouvert entre les 5 nucléotides 53 et 1 192 définit un polypeptide de 380 acides aminés. La séquence code pour une protéine membranaire avec un peptide signal potentiel, un seul domaine transmembranaire et une courte queue intracytoplasmique.

Quatre sites de N-glycosylation potentiels 10 sont localisés dans la région extracellulaire. Il est important de noter que deux motifs consensus considérés comme des signatures de la famille des récepteurs de cytokine de type II (27) sont aussi présents, le premier étant dérivé d'une structure en boucle de pont disulfure 15 N-terminal, le second étant le motif de type WSXWS localisé à l'extrémité C-terminale de la région extra cellulaire. La très courte séquence cytoplasmique pourrait expliquer pourquoi c'est seulement le complexe 20 récepteur partagé par l'IL-4 et par l'IL-13 dans les cellules Caki qui transduit un signal dans la cellule.

Des études d'alignement démontrent des homologies avec la chaîne  $\alpha$  de l'IL-5R humain (51 % de similarité et 27 % d'identité, figure 2b) et à un degré moindre, avec le récepteur de la prolactine. IL est intéressant de noter que le complexe IL-5R est constitué 25 d'une chaîne  $\alpha$  qui lie l'IL-5 mais qui a besoin d'une autre protéine, la chaîne  $\beta$  partagée avec les récepteurs de l'IL-3 et du GM-CSF, pour former un récepteur de haute affinité qui est capable de transduire un signal (28).

30

35

**EXEMPLE 4 :**

## Détection des ARN messagers de l'IL-13R dans différentes lignées cellulaires

5 De façon surprenante, dans les cellules Caki-  
10 1 des quantités similaires d'ARN messagers de l'IL-13R et IL-4R sont détectées par des analyses de northern bien qu'un large excès d'IL-13R soit exprimé. Cette observation suggère qu'il y a une plus forte traduction de cet ARNm par rapport au transcript de l'IL-4R et explique l'absence de détection de l'ARNm de l'IL-13R dans les lignées cellulaires exprimant un faible nombre de sites de liaison de l'IL-13. Des analyses par RT-PCR (figure 15 3) montrent que le transcript trouvé dans les cellules Caki-1 est aussi présent à des degrés inférieurs dans la lignée kératinocytaire A431, les cellules prémyéloïdes TF-1, les cellules prémocytiques U937, et la lignée cellulaire B IM9. Aucun transcript n'est détecté dans la lignée cellulaire T Jurkat ni dans la lignée cellulaire pré-B NALM6. Ces résultats sont en accord avec des études de liaison de l'IL-13 sur ces mêmes lignées précédemment décrites par les auteurs de la présente invention (17), 20 et avec les cibles biologiques connues de l'IL-13.

25

**EXEMPLE 5 :**

## Analyses de liaison réalisées sur des cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R

30 Les cellules COS-7 transfectées avec l'ADNC isolé codant pour l'IL-13R lient spécifiquement l'IL-13 marquée. L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre un seul site composant avec une  $K_d$  d'une valeur de  $250 \pm 30 \text{ pM}$  et une capacité de liaison maximale de  $5,6 \cdot 10^5$  récepteurs/cellule (figure 4a).

35 L'affinité du récepteur recombinant est en

bon accord avec la valeur de  $K_d$  de 446 pM pour l'IL-13R dans les cellules Caki-1 et pour ce qui a été décrit dans plusieurs autres cellules (17). Donc, malgré l'homologie de séquence avec la chaîne  $\alpha$  de l'IL-5R, le récepteur 5 cloné se comporte différemment puisqu'il n'a pas besoin d'une seconde chaîne pour reconstituer un site de liaison de haute affinité.

Il est intéressant de noter que la protéine liant l'IL-15 récemment décrite possède de la même façon 10 la caractéristique de lier avec une forte affinité l'IL-15, en l'absence des deux autres composants du complexe IL-15R (29).

Dans des expériences de compétition, l'IL-13 est capable d'inhiber la liaison de l'IL-13 marquée au 15 récepteur cloné, avec une constante d'inhibition ( $K_i$ ) de  $1,5 \pm 0,5$  nM, alors que l'IL-4 n'inhibe pas la liaison. La pharmacologie du récepteur cloné est donc similaire à celle de l'IL-13R présent dans les cellules Caki-1. Des expériences de pontage montrent une bande radiomarquée 20 de 70 kDa. Cette bande a la même mobilité que celle observée dans les cellules Caki ainsi que dans d'autres cellules (17). Ce complexe correspond très probablement à la bande de 60-70 kDa observée en plus de la bande de 140 kDa de l'IL-4R dans les expériences de pontage 25 réalisées avec l'IL-4 marquée. Ceci pourrait aussi suggérer qu'il existe une forte interaction entre les deux protéines dans le complexe récepteur fonctionnel.

Les auteurs de la présente invention ont donc 30 vérifié si l'IL-13R et l'IL-4R interagissent dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur qui permet une compétition croisée des deux cytokines. Les résultats d'expérience de coexpression sont montrés dans la figure 4, c et d.

Il apparaît clairement que l'expression des 35 deux récepteurs soit isolée soit simultanée, résulte en

un grand nombre de récepteurs qui reconnaissent spécifiquement l'une ou l'autre des deux cytokines. Toutefois, lorsqu'ils sont exprimés ensemble, un petit nombre de récepteurs (5 à 10 %) est capable de reconnaître les deux cytokines. La cotransfection de la chaîne  $\gamma c$  avec l'IL-4R et l'IL-13R ne procure pas une augmentation dans le nombre de sites de liaison partagés. Ces résultats suggèrent que les chaînes de l'IL-13R et IL-4R peuvent interagir l'une avec l'autre dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur pour lequel l'IL-13 et l'IL-4 peuvent être en compétition. Le faible pourcentage de récepteurs reconstitués est un argument en faveur de la présence d'une autre protéine en quantités limitantes dans les cellules COS, nécessaire pour la reconstitution du complexe récepteur auquel se lient en compétitivité l'IL-13 et l'IL-4.

Les résultats obtenus dans les expériences de transfection avec la chaîne  $\gamma c$  démontrent que cette protéine n'est pas le facteur limitant qui avait été suggéré auparavant (15). Cette conclusion est aussi supportée par l'absence d'ARN messager de  $\gamma c$  dans les cellules Caki-1 (21).

Une autre raison possible pour expliquer le faible nombre de récepteurs reconstitués est l'existence d'une stoechiométrie incorrecte des deux protéines dans la membrane cellulaire. Toutefois, des cotransfactions utilisant des quantités relatives différentes d'IL-4R et d'IL-13R ne montrent pas de différence majeure dans le nombre de récepteurs reconstitués. La possibilité qu'il existe un autre IL-13R avec une plus forte capacité à interagir avec IL-4R, ne peut pas être exclue. Il doit être noté que l'expression de  $\gamma c$  améliore la liaison de l'IL-4 comme cela a été précédemment décrit (19) mais diminue la liaison de l'IL-13, suggérant une interaction complexe entre les différentes chaînes.

**EXEMPLE 6 :**

5      **Etude de l'inhibition de la liaison de l'IL-13 à son récepteur membranaire par un récepteur sous forme soluble.**

On décrit les résultats en expression transitoire (figure 5) ou sur les lignées stables (figure 6).

10     Les deux séquences d'ADNC, codant pour l'IL-13R et pour l'IL-13Rs sont insérées dans le vecteur p7055 à la place de l'ADNC de l'IL-2 (30). Les plasmides résultants sont nommés 2036 et 2034 respectivement.

**1. Expression transitoire**

15     Les cellules CHO sont ensemencées en plaques 12 puits à  $3.10^5$  cellules/puits et transfectées le lendemain par la méthode DEAE-Dextran comme pour les cellules COS, soit avec le plasmide 2036 ou 2034, soit avec le plasmide pSEI vide comme témoin.

20     Les cellules sont cultivées pendant trois jours de façon à permettre une accumulation de l'IL-13Rs dans le surnageant des cellules transfectées avec le plasmide 2034 et une bonne expression de l'IL-13R à la membrane des cellules transfectées avec le plasmide 2036.

25     Le surnageant des cellules transfectées avec l'IL-13Rs (2034) ou le témoin négatif (pSEI vide) est alors prélevé et les cellules transfectées avec l'IL-13R sont utilisées pour l'étude de l'inhibition de la liaison de l'IL-13.

30     La liaison de l'IL-13 à la surface des CHO exprimant l'IL-13R (2036) est mesurée en présence ou non de ces surnageants bruts dilués de moitié avec le radioligand ou en présence d'un excès d'IL-13 non radiomarquée (NSB). La liaison s'effectue sur les cellules entières dans un volume final de 500  $\mu$ l avec 300 pM de radioligand, en triplicata.

## 2. Lignées stables

Deux lignées stables de CHO transformées sont obtenues par transfection avec les séquences codantes de l'IL-13R complet (polypeptide de 380 résidus) ou de l'IL-13R sous forme soluble (IL-13Rs, polypeptide tronqué, correspondant aux résidus 1 à 337 de l'IL-13R). Ces séquences sont insérées dans le vecteur p 7055.

5 Les cellules CHO-DHFR<sup>-</sup> sont transfectées avec les plasmides 2036 (IL-13R) et 2034 (IL613RS) et les 10 clones recombinants sélectionnés comme décrit précédemment (30).

15 L'un des clones CHO-IL-13R (CHO 2036) obtenus, présentant 2 à 5.10<sup>5</sup> sites par cellules est ensemencé en plaque 12 puits à une densité de 10<sup>5</sup> cellules par puits et les cellules sont utilisées deux 20 jours près pour des expériences de liaison en présence ou non d'IL-13Rs.

25 Pour cela, les clones CHO-IL-13Rs (CHO 2034) sont ensemencés en boîtes de 6 cm<sup>2</sup>, en triplicata à 5.10<sup>5</sup> cellules par boîte. Après 3 jours d'accumulation dans le milieu de culture, le milieu (5 ml par boîte) est prélevé pour les études d'inhibition de liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R du clone CHO 2036. De la même façon, le surnageant de cellules CHO n'exprimant pas l'IL-13R soluble est prélevé.

30 La liaison de l'IL-13 à la surface du clone CHO 2036-22 est mesurée en présence ou non de ces surnageants bruts dilués de moitié avec le radioligand, ou en présence d'un excès d'IL-13 non radiomarquée (NSB). La liaison s'effectue en triplicata, sur les cellules entières, dans un volume de 500 µl avec 300 pM de radioligand.

35 Les histogrammes des figures 5 et 6 représentent l'inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R par l'IL-13Rs. Une inhibition de la liaison de l'IL-13 à son récepteur peut s'observer sur plusieurs clones.

Le clonage de l'IL-13R décrit ici permet  
5 d'améliorer la connaissance des facteurs intervenant dans  
les réponses spécifiquement induites par l'IL-13 par  
rapport aux réponses induites par l'IL-4. Il permet en  
outre de disposer d'un outil pour l'étude de la régula-  
10 tion de l'expression du récepteur dans des conditions  
normales et pathologiques où l'IL-13 joue un rôle clé.

Par ailleurs, la disponibilité de l'ADNC  
permet de faciliter le clonage d'autres protéines néces-  
saires pour la reconstitution d'un complexe récepteur IL-  
4/IL-13 et est également utile pour la fabrication ou la  
15 modélisation rationnelle de nouveaux médicaments capables  
d'être des antagonistes spécifiques des activités de  
l'IL-4 et de l'IL-13.

**References:**

1. Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B., Minty, C., Casellas, P., Loison, G., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P. and Caput, D. (1993) *Nature*, 362, 248-250.
2. McKenzie, A.N., Culpepper, J.A., de Waal Malefyt, R., Briere, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G., Menon, S., de Vries, J.E., Banchereau J. and Zurawski, G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* , 90, 3735-3739.
3. Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot J-C, Minty A, Caput D, Ferrara P. *J Exp. Med.* 1994 . 179 : 135-143.
4. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. *Proc. Natl. Acad.Sci (USA)* 1993 ; 90 : 3730-3734.
5. Fior R, Vita N, Raphael M, Minty A, Maillot M-C, Crevon M-C, Caput D, Biberfeld P, Ferrara P, Galanaud P, Emilie D. *Eur. Cytokine Network* 1994. 5, 593-600.
6. Muzio M, Re F, Sironi M, Polentarutti N, Minty A, Caput D, Ferrara P, Mantovani A, Colatta F. *Blood* 1994. 83, 1738-1743.
7. de Waal Malefyt R, Figgdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries JE. *J.Immunol.* 1993 ; 151 : 6370-6381.
8. Doyle A, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, Gordon S. *Eur. J. Immunol.* 1994 . 24, 1441 - 1445.
9. Montaner LJ, Doyle AG, Collin M, Herbein G, Illei P, James W, Minty A, Caput D, Ferrara P, Gordon S. *J Exp Med* 1993 . 178 , 743-747.

10. Sozzani P, Cambon C, Vita N, Séguelas M-H, Caput D, Ferrara P and Pipy B. 1995. *J. Biol. Chem.* 270, 5084-5088.
11. Herbert JM, Savi P, Laplace MC, Lale A, Dol F, Dumas A, Labit C, Minty A. IL-4 and IL-13 exhibit comparable abilities to reduce pyrogen-induced expression of procoagulant activity in endothelial cells and monocytes. *FEBS Letters* 1993 ; 328 : 268-270.
12. Derocq J-M, Segui M, Poinot-Chazel C, Minty A, Caput D, Ferrara P, Casellas P. Interleukin-13 stimulates interleukin-6 production by human keratinocytes . Similarity with interleukin-4. 18994. *FEBS Lett.* 343, 32-36 .
13. Zurawski G, de Vries JE. *Immunol. Today* 1994. 15, 19 - 26
14. Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease. Eds D.G. REMICK and J.S. FRIEDLAND, Marcel DECKER, N.Y. 1996
15. Zurawski SM, Vega F, Huyghe B, Zurawski G. *EMBO Journal* 1993. 12, 2663-2670.
16. Aversa G, Punnonen J , Cocks BG, de Waal Malefyt R , Vega F, Zurawski SM, Zurawski G and de Vries J E . *J. Exp. Med.* 1993.178, 2213 - 2218
17. Vita N, Lefort S, Laurent P, Caput D, Ferrara P. *J. Biol. Chem.* 1995. 270, 3512-3517.
18. Lefort S, Vita N, Reeb R, Caput D and Ferrara P. *FEBS Lett.* 1995. 366, 122-126.
- 19 Kondo M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, Watanabe S, Arai K, Sugamura K. *Science* 1993. 262 , 1874-1883.

20. Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedman MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE, Leonard WJ. *Science* 1993 . 262, 1880-1883
21. Obiri N., Debinsky W., Leonard W.J., Puri R.K. *J.Biol.Chem.*, 1995, 270, 8797-8804.
22. Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395 (1984).
23. Chomczynski, P. & Sacchi, N. *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (1987).
24. Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Schimer, S. and Cerami, A. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 83, 1670-1674, 1986.
25. Minty, A., Chalon, P., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Liauzun, P., Magazin, M., Miloux, B., Minty, C., Ramond, P., Vita, N., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P. and Caput, D. *Eur. Cytokine Network.* 4, 99-110, 1993.
26. Seed, B. and Arrufo, A. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 84, 3365-3369, 1987.
27. Bazan, J.F. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 87, 6934-6938, 1990.
- 28 Honjo T. *Current Opinion in Cell Biology* 1, 201-203, 1991.
29. Giri, J.G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D.J., Loomis A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L.S. and Anderson D.M. *EMBO Journal* 14, 3654-3663, 1993. .
30. Miloux, B. and Lupker, J.H. *Rapid isolation of highly productive recombinant Chinese Hamster Ovary cell lines. Gene* 149, 1994, 341-344.

## LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: SANOFI
- (B) RUE: 32 34 RUE MARBEUF
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75374
- (G) TELEPHONE: 53774000
- (H) TELECOPIE: 53774133

(ii) TITRE DE L' INVENTION: IL-13 racapteur

(111) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME DECHIFFERABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release £1.0, Version £1.30 (QEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1298 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iv) ANTI-SENS: NON

(v:) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Homo sapiens*  
(F) TYPE DE TISSU: *Carcinoma*  
(G) TYPE DE CELLULE: *renal*  
(H) LIGNEE CELLULAIRE: *Caki-1*

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 53.1192

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ACA GTG GAA TAT GAA CTA AAA TAC CGA AAC ATT GGT AGT GAA ACA TGG Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr Trp 70 75 80	295
AAG ACC ATC ATT ACT AAG AAT CTA CAT TAC AAA GAT GGG TTT GAT CTT Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp Leu 85 90 95	343
AAC AAG GGC ATT GAA GCG AAG ATA CAC ACG CTT TTA CCA TGG CAA TGC Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln Cys 100 105 110	391
ACA AAT GGA TCA GAA GTT CAA AGT TCC TGG GCA GAA ACT ACT TAT TGG Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr Trp 115 120 125	439
ATA TCA CCA CAA GGA ATT CCA GAA ACT AAA GTT CAG GAT ATG GAT TGC Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp Cys 130 135 140 145	487
GTA TAT TAC AAT TGG CAA TAT TTA CTC TGT TCT TGG AAA CCT GGC ATA Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly Ile 150 155 160	535
GGT GTA CTT CTT GAT ACC AAT TAC AAC TTG TTT TAC TGG TAT GAG GGC Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu Gly 165 170 175	583
TTG GAT CAT GCA TTA CAG TGT GTT GAT TAC ATC AAG GCT GAT GGA CAA Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly Gln 180 185 190	631
AAT ATA GGA TGC AGA TTT CCC TAT TTG GAG GCA TCA GAC TAT AAA GAT Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys Asp 195 200 205	679
TTC TAT ATT TGT GTT AAT GGA TCA TCA GAG AAC AAG CCT ATC AGA TCC Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg Ser 210 215 220 225	727
AGT TAT TTC ACT TTT CAG CTT CAA AAT ATA GTT AAA CCT TTG CCG CCA Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro Pro 230 235 240	775
GTC TAT CTT ACT TTT ACT CGG GAG AGT TCA TGT GAA ATT AAG CTG AAA Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu Lys 245 250 255	823
TGG AGC ATA CCT TTG GGA CCT ATT CCA GCA AGG TGT TTT GAT TAT GAA Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr Glu 260 265 270	871
ATT GAG ATC AGA GAA GAT GAT ACT ACC TTG GTG ACT GCT ACA GTT GAA Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val Glu 275 280 285	919
AAT GAA ACA TAC ACC TTG AAA ACA ACA AAT GAA ACC CGA CAA TTA TGC Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu Cys 290 295 300 305	967
TTT GTA GTA AGA AGC AAA GTG AAT ATT TAT TGC TCA GAT GAC GGA ATT Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly Ile 310 315 320	1015

TGG AGT GAG TGG AGT GAT AAA CAA TGC TGG GAA GGT GAA GAC CTA TCG Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu Ser 325 330 335	1063
AAG AAA ACT TTG CTA CGT TTC TGG CTA CCA TTT GGT TTC ATC TTA ATA Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Ile 340 345 350	1111
TTA GTT ATA TTT GTA ACC GGT CTG CTT TTG CGT AAG CCA AAC ACC TAC Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr Tyr 355 360 365	1159
CCA AAA ATG ATT CCA GAA TTT TTC TGT GAT ACA TGAAGACTTT CCATATCAAG Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr 370 375 380	1212
AGACATGGTA TTGACTCAAC AGTTTCCAGT CATGGCCAAA TGTTCAATAT GAGTCTCAAT	1272
AAACTGAATT TTTCTTGCAG ATGTTG	1298

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 380 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

i) TYPE DE MOLECULE: protéine

ii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile	1	5	10	15
Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val	20	25	30	
Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr	35	40	45	
Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu	50	55	60	
Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr	65	70	75	80
Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp	85	90	95	
Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln	100	105	110	
Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr	115	120	125	
Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp	130	135	140	
Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly	145	150	155	160
Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Gl	165	170	175	
Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gl	180	185	190	

Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys  
195 200 205

Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg  
210 215 220

Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro  
225 230 235 240

Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu  
245 250 255

Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr  
260 265 270

Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val  
275 280 285

Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu  
290 295 300

Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly  
305 310 315 320

Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu  
325 330 335

Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu  
340 345 350

Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr  
355 360 365

Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr  
370 375 380

## REVENDICATIONS

1. Polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :

5 a) la séquence SEQ ID n° 2,  
b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 2.

10 2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2.

15 3. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une forme variante du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 dans laquelle les 8 résidus C-terminaux sont substitués par les 6 résidus suivants : NH<sub>2</sub>-VRCVTL-COOH.

20 4. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une forme soluble s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'au résidu 337.

25 5. Séquence d'acides nucléiques isolée codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes.

30 6. Séquence d'acides nucléiques isolée selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

35 a) la séquence SEQ ID n° 1,  
b) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 1 et codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur de l'IL-13,

c) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) du fait de la dégénérescence du code génétique.

5 7. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1081, et préférentiellement jusqu'au nucléotide 1063 sur la 10 séquence SEQ ID n° 1.

8. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7.

15 9. Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide PSE-1.

20 10. Cellule hôte transfectée par un vecteur selon la revendication 8 ou 9.

11. Cellule hôte transfectée selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée COS-7.

25 12. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle hybride spécifiquement avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 5 à 7, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants.

30 13. Sonde selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 nucléotides.

35 14. Sonde selon la revendication 12,

caractérisée en ce qu'elle comprend l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire.

5 15. Séquence antisens capable d'inhiber, au moins partiellement, la production de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences constituant le cadre de lecture codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 au niveau du  
10 transcript.

15 16. Utilisation d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, pour la réalisation de sondes nucléotidiques de diagnostic ou de séquences antisens utilisables en thérapie génique.

20 17. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, comme outil de diagnostic IN VITRO pour la détection, par des expériences d'hybridation, des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans des échantillons biologiques, ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou  
25 d'anomalies génétiques telles que la perte d'hétérozygotie ou le réarrangement génétique.

30 18. Utilisation d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, pour la détection d'anomalies chromosomiques.

35 19. Méthode de diagnostic IN VITRO pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques au niveau des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend :

5 - la mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 12 à 14 avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;

10 - la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;

15 - éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.

20. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, pour la production d'un polypeptide recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

21. Méthode de production d'un polypeptide recombinant récepteur de l'IL-13, caractérisée en ce que l'on cultive des cellules transfectées selon la revendication 10 ou 11 dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou dérivée, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

22. Anticorps mono ou polyclonaux, anticorps conjugués, ou leur fragments, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

23. Utilisation des anticorps selon la revendication précédente, pour la purification ou la détection d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans un échantillon biologique.

24. Procédé de diagnostic *IN VITRO* de pathologies corrélées à une expression anormale du récepteur de l'IL-13, à partir de prélèvements biologiques susceptibles de contenir le récepteur de l'IL-13 exprimé à un taux anormal, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un anticorps selon la revendication 20 avec ledit prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et le ou lesdits anticorps et en ce que l'on détecte les complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

15 25. Kit pour le diagnostic *IN VITRO* d'une expression anormale du récepteur de l'IL-13 dans un prélèvement biologique et/ou pour la mesure du taux d'expression du récepteur de l'IL-13 dans ledit prélèvement comprenant :

20 - au moins un anticorps spécifique du récepteur de l'IL-13 selon la revendication 22, éventuellement fixé sur un support,

25 - des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et ledit anticorps et/ou des moyens de quantification de ces complexes.

30 26. Méthode pour l'identification et/ou l'isolement de polypeptides selon la revendication 1, ou d'agents capables de moduler leur activité, caractérisée en ce que l'on met en contact un composé ou un mélange contenant différents composés, éventuellement non-identifiés, avec des cellules exprimant à leur surface un polypeptide selon la revendication 1, dans des conditions permettant l'interaction entre le polypeptide et

35

ledit composé dans le cas où celui-ci possèderait une affinité pour le polypeptide, et en ce que l'on détecte et/ou isole les composés liés au polypeptide ou ceux capables d'en moduler l'activité biologique.

5

27. Ligand ou modulateur d'un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 4 susceptible d'être obtenu selon la méthode de la revendication 26.

10

28. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

15

29. Composition pharmaceutique selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide selon la revendication 4.

20

30. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour le criblage d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R.

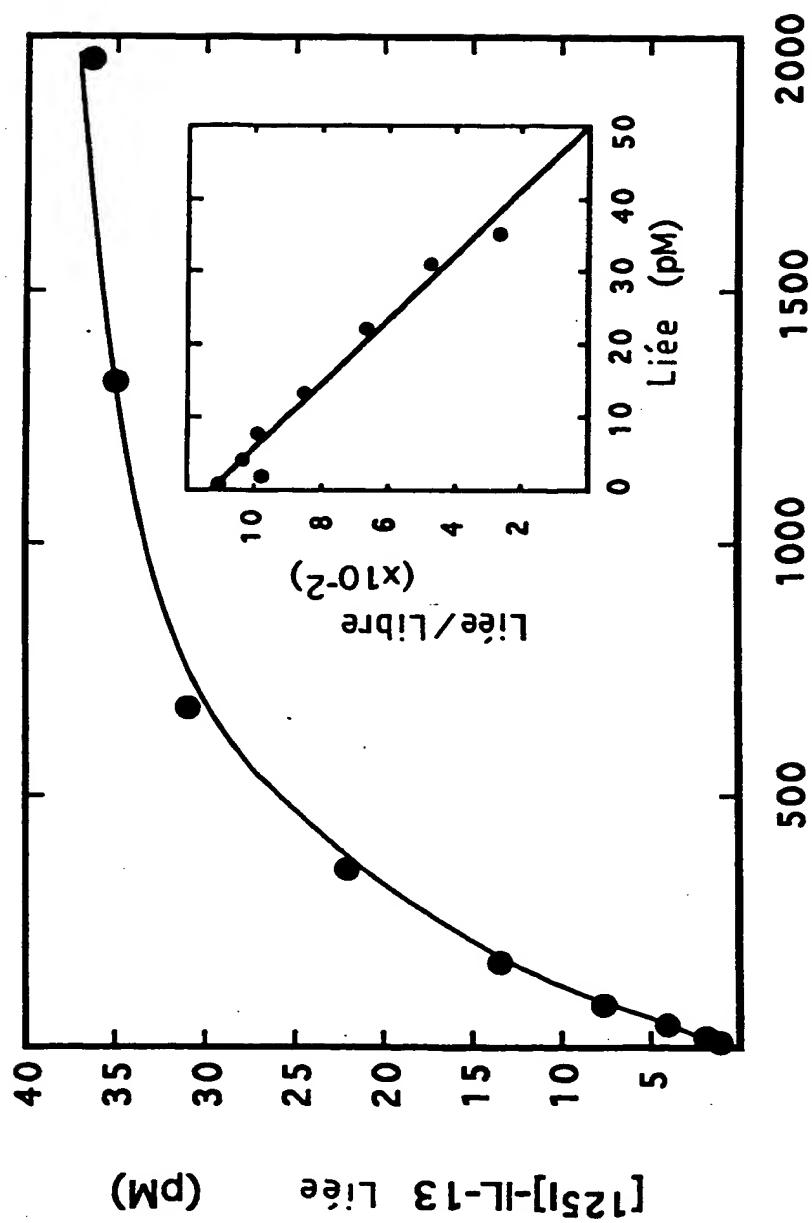
25

31. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la fabrication de produits capables de moduler l'activité de l'IL-13R.

32. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 4 pour la synthèse d'un médicament à effet antagoniste de l'IL-13.

30

1 / 12

 $[125\text{I}]\text{-IL-13}$  (pM)FIG. 1a

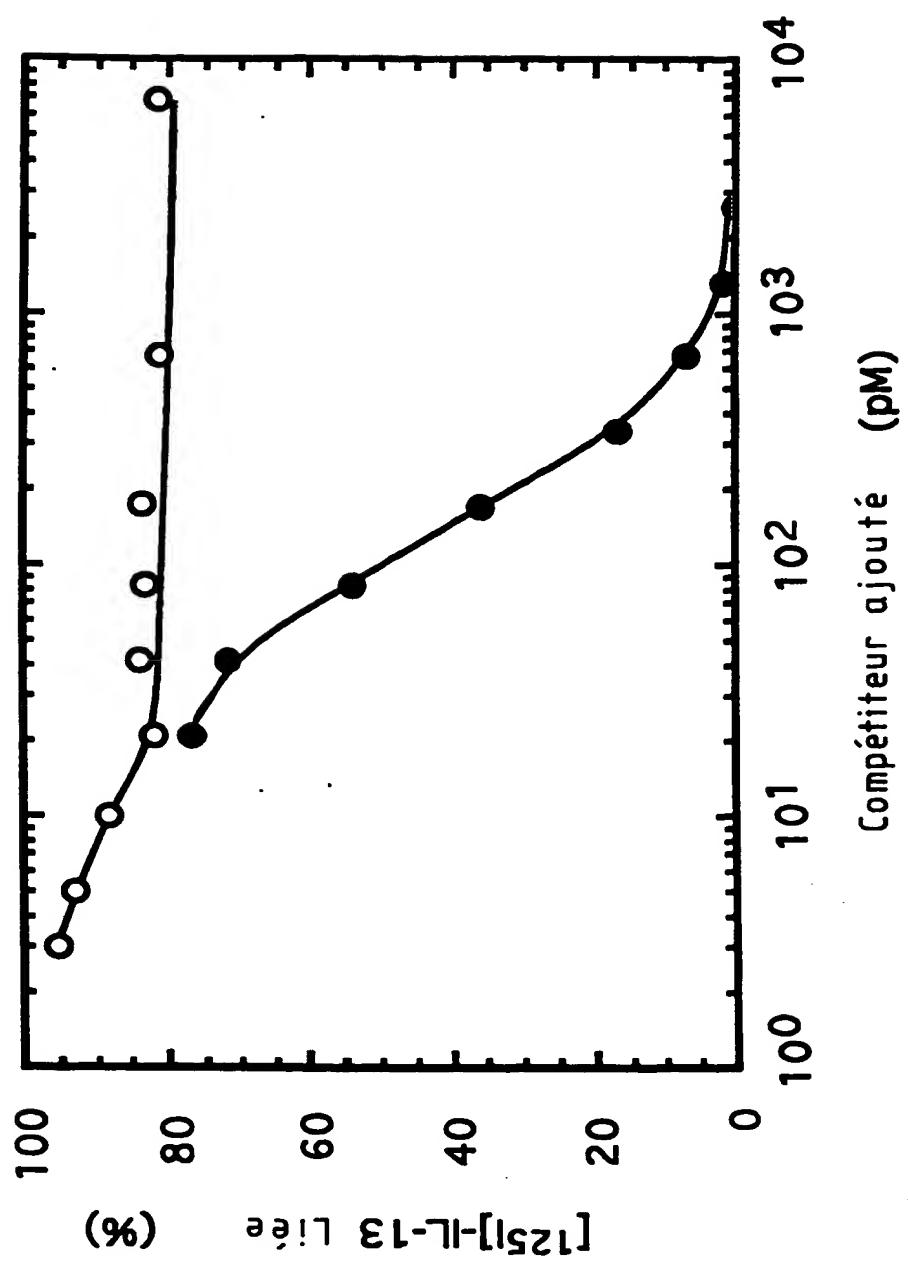


FIG.1b

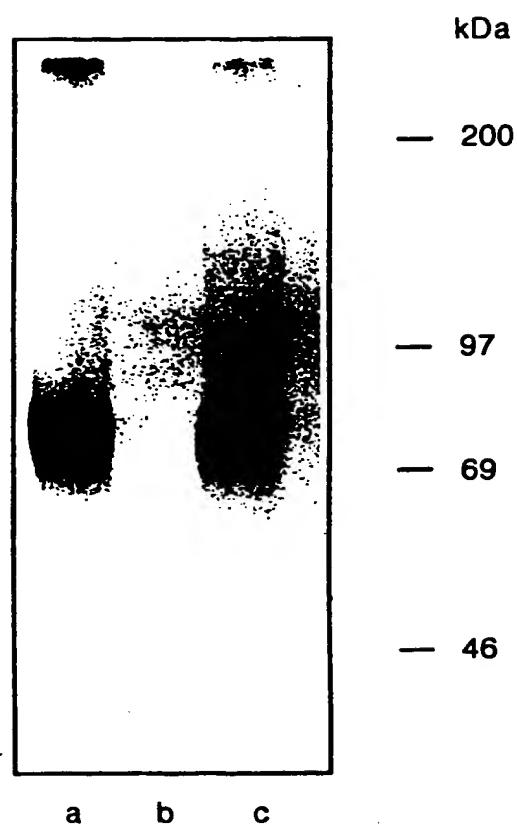


FIG. 1c

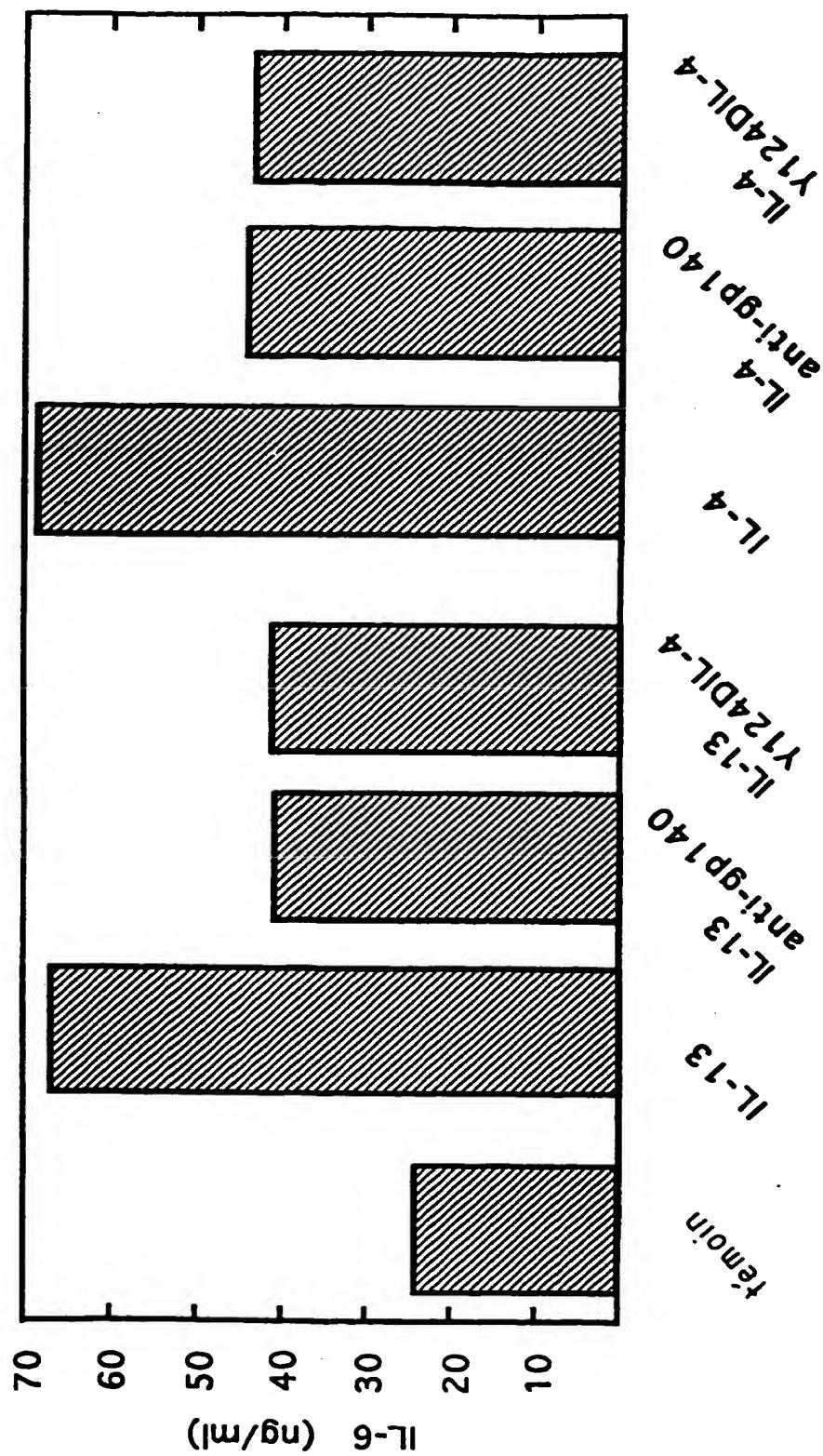


FIG. 1d

1	GGTGCCTGTCGGCGGGGAGAGAGGCAATATCAAGGTTAAATCTGGAGAAATGGCT	58
1	MetAla	2
59	TTCGTTGCTTGGCTATCGGATGCTTATACCTTCTGATAAGCACAACATTGGCTGT	118
3	PheValCysLeuAlaIleGlyCysLeuTyrThrPheLeuIleSerThrThrPheGlyCys	22
119	ACTTCATCTTCAGACACCGAGATAAAAGTTAACCTCCTCAGGATTTGAGATAGTGGAT	178
23	ThrSerSerSerAspThrGluIleLysValAsnProProGlnAspPheGluIleValAsp	42
179	CCCGGATACTTAGGTTATCTCTATTGCAATGGCAACCCCCACTGTCTCTGGATCATTTT	238
43	ProGlyTyrLeuGlyTyrLeuTyrLeuGlnTrpGlnProProLeuSerLeuAspHisPhe	62
239	AAGGAATGCACAGTGGAAATATGAACTAAAATACCGAACATTGGTAGTGAACATGGAAG	298
63	LysGluCysThrValGluTyrGluLeuLysTyrArgAsnIleGlySerGluThrTrpLys	82
299	ACCATCATTACTAAGAACATCTACATTACAAAGATGGGTTGATCTAACAAAGGGCATTGAA	358
83	ThrIleIleThrLysAsnLeuHisTyrLysAspGlyPheAspLeuAsnLysGlyIleGlu	102
359	GCGAAGATAACACACGTTTACCATGGCAATGCACAAATGGATCAGAAGTTCAAAGTTCC	418
103	AlaLysIleHisThrLeuLeuProTrpGlnCysThrAsnGlySerGluValGlnSerSer	122
419	TGGGCAGAAACTACTTATTGGATATCACCACAGGAATTCCAGAAAATAAAGTTCAAGGAT	478
123	TrpAlaGluThrThrTyrTrpIleSerProGlnGlyIleProGluThrLysValGlnAsp	142
479	ATGGATTGCGTATATTACAATTGCAATATTACTCTGTTCTGGAAACCTGGCATAGGT	538
143	MetAspCysValTyrTyrAsnTrpGlnTyrLeuLeuCysSerTrpLysProGlyIleGly	162
539	GTACTCTTGATACCAATTACAACCTGTTACTGGTATGAGGGCTGGATCATGCATTA	598
163	ValLeuLeuAspThrAsnTyrAsnLeuPheTyrTrpTyrGluGlyLeuAspHisAlaLeu	182
599	CAGTGTGTTGATTACATCAAGGCTGATGGACAAAATATAGGATGAGATTTCCCTATTG	658
183	GlnCysValAspTyrIleLysAlaAspGlyGlnAsnIleGlyCysArgPheProTyrLeu	202
659	GAGGCATCAGACTATAAGATTCTATATTGTGTTAATGGATCATCAGAGAACAGCCT	718
203	GluAlaSerAspTyrLysAspPheTyrIleCysValAsnGlySerSerGluAsnLysPro	222
719	ATCAGATCCAGTTATTCACTTTCAGCTCAAAATATAGTTAACCTTGCCGCCAGTC	778
223	IleArgSerSerTyrPheThrPheGlnLeuGlnAsnIleValLysProLeuProProVal	242
779	TATCTTACTTTACTCGGGAGAGTTCATGTGAAATTAAAGCTGAAATGGAGCATACCTT	838
243	TyrLeuThrPheThrArgGluSerSerCysGluIleLysLeuLysTrpSerIleProLeu	262
839	GGACCTATTCCAGCAAGGTGTTGATTATGAAATTGAGATCAGAGAAGATGATACTACC	898
263	GlyProIleProAlaArgCysPheAspTyrGluIleGluIleArgGluAspAspThrThr	282
899	TTGGTGAACGCTACAGTTGAAAATGAAACATACACCTTGAAAACAACAAATGAAACCCGA	958
283	LeuValThrAlaThrValGluAsnGluThrTyrThrLeuLysThrThrAsnGluThrArg	302
959	CAATTATGCTTGAGTAAGAACGAAAGTGAATATTATTGCTCAGATGACGGAATTGG	1018
303	GlnLeuCysPheValValArgSerLysValAsnIleTyrCysSerAspAspGlyIleTrp	322
1019	AGTGAGTGGAGTGATAAACAAATGCTGGAGGTGAAGACCTATCGAAGAAAATTTGCTA	1078
323	SerGluTrpSerAspLysGlnCysTrpGluGlyGluAspLeuSerLysLysThrLeuLeu	342
1079	CGTTCTGGCTACCATTTGGTTCATCTTAATATTAGTTATTTGTAACCGGTCTGCTT	1138
343	ArgPheTrpLeuProPheGlyPheIleLeuIleLeuValIlePheValThrGlyLeuLeu	362
1139	TTGCGTAAGCCAAACACCTACCCAAAAATGATTCCAGAATTCTGTGATACATGAAGA	1198
363	LeuArgLysProAsnThrTyrProLysMetIleProGluPhePheCysAspThr	381
1199	CTTTCCATATCAAGAGACATGGTATTGACTCAACAGTTCCAGTCATGGCCAAATGTTCA	1258
1259	ATATGAGTCTCAATAAACTGAATTCTTGCAGATGTTG	1298

FIG. 2a

IL13R	MAFVCLAI GCLYTFLISTTFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYLY 50
IL5R	..MIIVAHVLLILLGATEILQADLLPDEKISLLPPVNFTIKVTG.LAQVL 47
IL13R	LQWQPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTITKNLHYKDGFDLNKG 100
IL5R	LQWKPNPDQEQR.NVNLEYQVKINAPKEDDYETRITES...KCVTILHKG 93
IL13R	IEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPQGI PETKVQDMDOV.... 146
IL5R	FSASVRTILQ...NDHSLLASSWASAE.LHAPPGSPGTSIVNLCTTTNTT 139
IL13R	..YYNWQ....YLLCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQOVDYIK 189
IL5R	EDNYSLRLRSYQVSLHCTWLVGTDAPEDTQYFLYYRYGSWTE..EQQEYSK 187
IL13R	AD.GQNIGORFP..YLEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIV 236
IL5R	DTLGRNIAQWFPRTFILSKGRDWLSVLVNGSSKHSAIRPFDQLFALHAID 237
IL13R	KPLPPVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPACFDYEIEIREDDTLVTA 286
IL5R	QINPPLNVTAEIEGT.RLSIQWEKPVSAFPIHCFDYEVKIHNRNGYLQI 286
IL13R	TVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNICYCSDDGIWSEWSDKQCWEGEDL 336
IL5R	EKLMTNAFISIIDDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGLWSEWSQ.PIYVGND 335
IL13R	SKKTLRLFWLPFGFILILVIFVTGLLRKPNTYPKMIP.....EF 376
IL5R	HKPLREWFVIVIMATICFILLILSLICKIHLWIKLFPPIPAPKSNIKDL 385
IL13R	FCDT..... 380
IL5R	FVTTNYEKAGSSETIEVICYIEKPGVETLEDVF 420

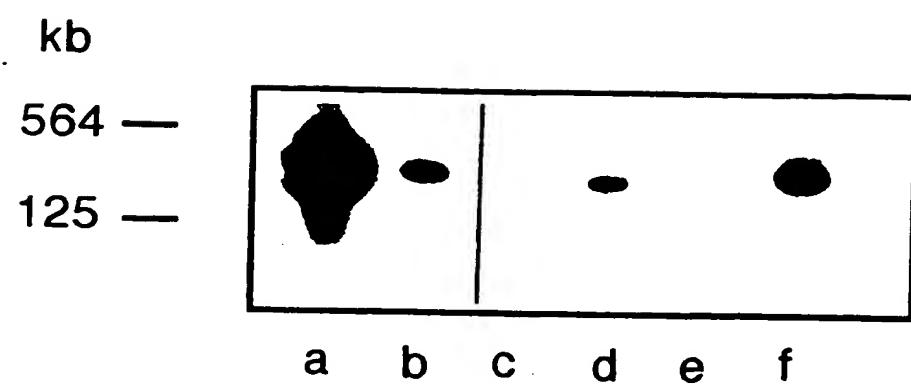


FIG. 3

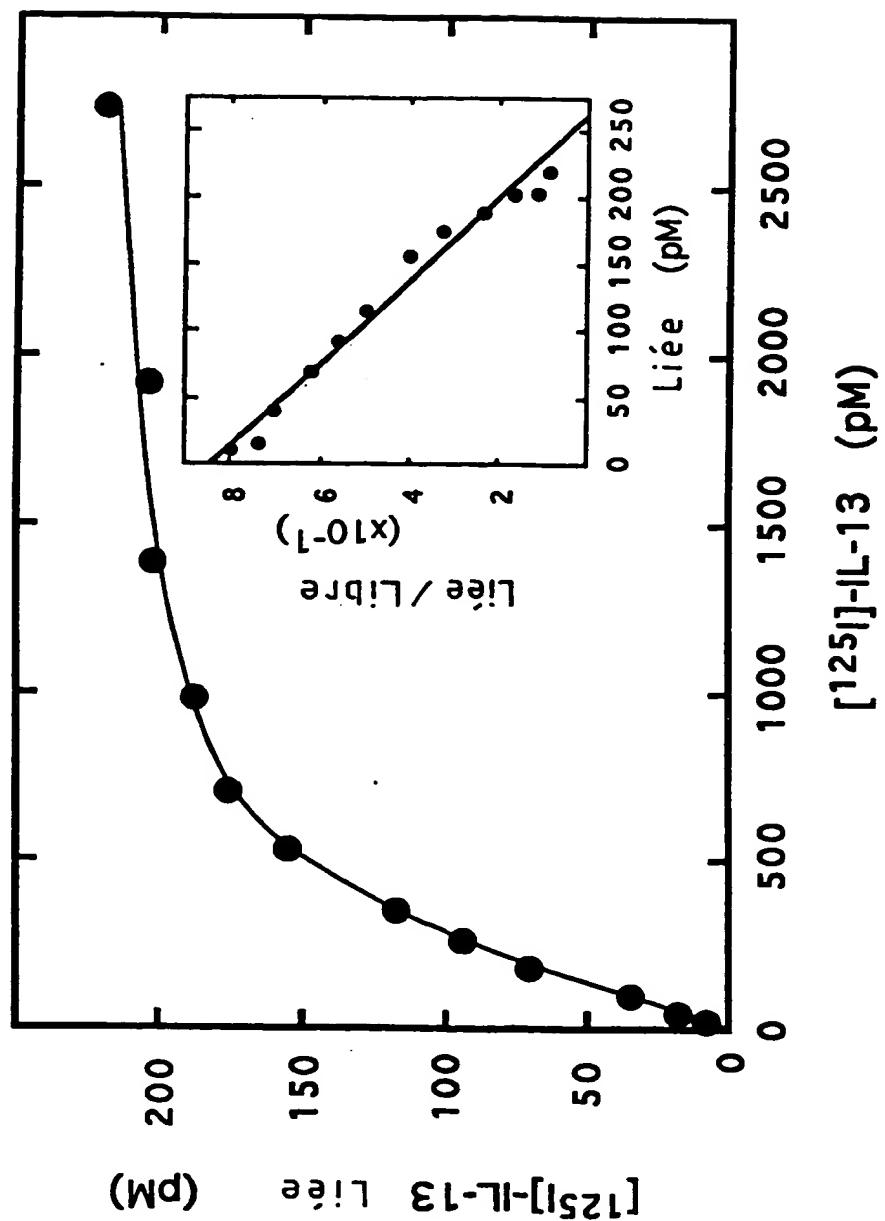


FIG. 4a

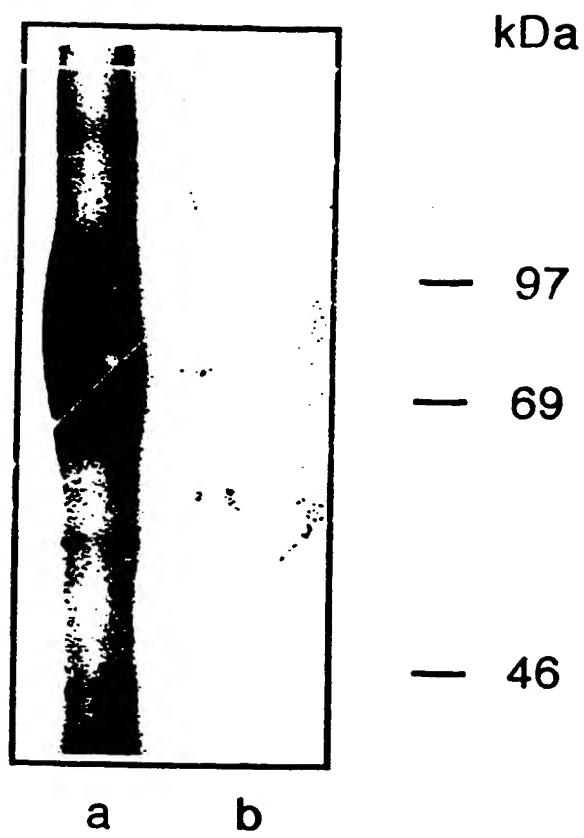


FIG. 7b

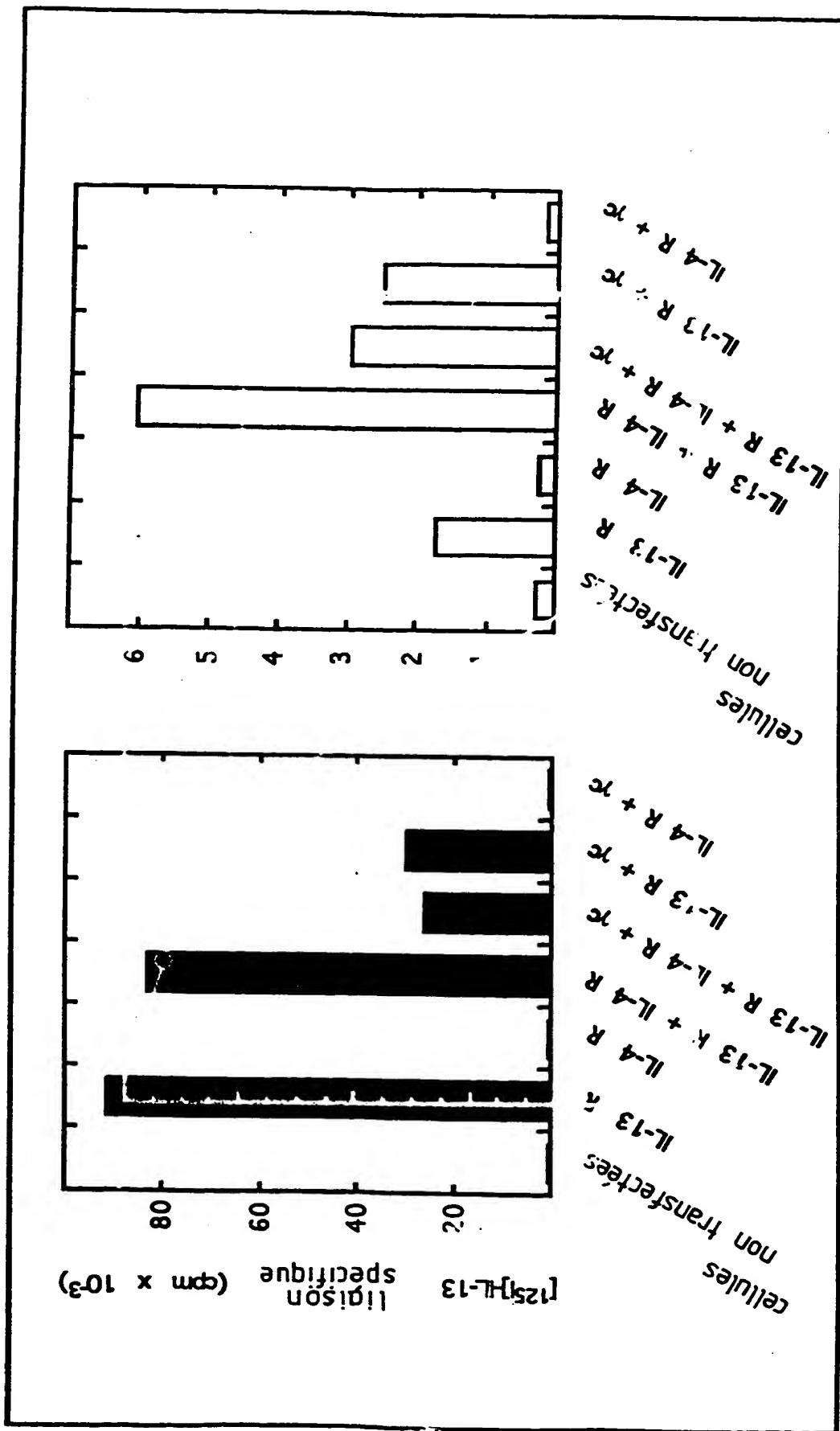
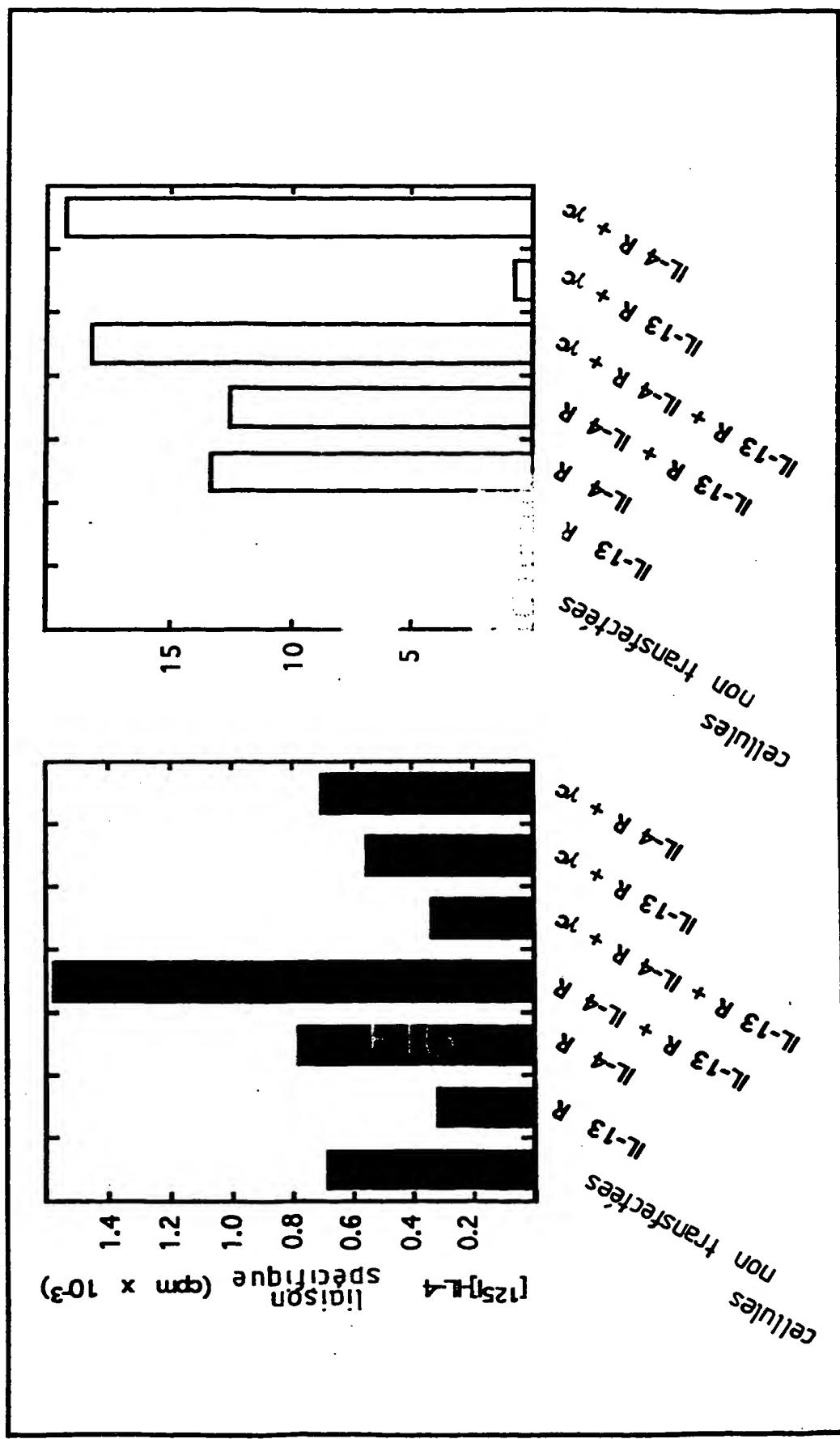


FIG. 4C

FIG. 4d



12/12

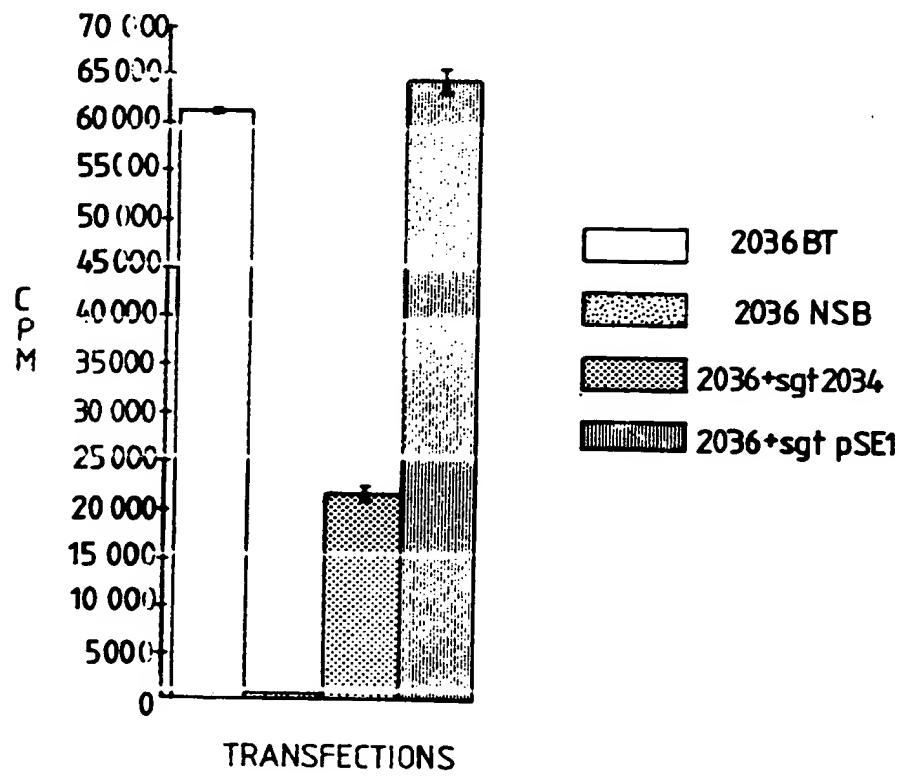


FIG.5

FIG.6

